บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

มะเร็ง เป็นกลุ่มของโรคที่เกิดจากเซลล์ไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัว และการเจริญเติบโตได้ ทำให้มีการจำลองเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดการบุกรุก (invasion) เนื้อเยื่อข้างเคียง และกระจายไปยังบริเวณต่างๆ ของร่างกาย (metastasis) โดยปกติแล้ว ชื่อของมะเร็งแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ขึ้นกับอวัยวะซึ่งเป็นจุดกำเนิดของเซลล์ที่เริ่มมีการแบ่งตัวผิดปกติ

มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) เป็นมะเร็งที่พบมากเป็นลำดับ 3 ในผู้หญิงทั่วโลก (Ferlay *et al.*, 2010) และมากเป็นอันดับ 2 ในผู้หญิงไทย (WHO, 2010) สาเหตุส่วนใหญ่มากกว่า 90% เกิดจากการติดเชื้อ high risk human papillomavirus (HR-HPV) ได้แก่ HPV ชนิด 16 และ 18 ผ่านการมีเพศสัมพันธ์ (Munoz *et al.*, 2003) เมื่อได้รับเชื้อ HPV แล้วนั้น เยื่อบุผิวบริเวณปากมดลูกอาจเข้าสู่กระบวนการเกิดมะเร็งที่มีกลไกหลายขั้น (multistep process) และพัฒนาเป็นมะเร็งปากมดลูกในระยะลุกลามได้ ซึ่งช่วงความกว้าง (spectrum) ของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ของมะเร็งปากมดลูก สามารถจำแนกเป็นระยะต่างๆ ได้ คือ pre-malignant lesion ได้แก่ low grade และ high grade squamous intraepithelial lesions (LSILs และ HSILs) และ malignant invasive cervical cancer (Brisson *et al.*, 1988) อย่างไรก็ดี ในระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อผู้ป่วยจะไม่แสดงอาการแต่อย่างใด ดังนั้น ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกส่วนใหญ่จึงมักมาพบแพทย์เมื่อเป็นมะเร็งในระยะลุกลาม ซึ่งยากต่อการรักษา การตรวจวิเคราะห์มะเร็งปากมดลูก ทำได้ 2 วิธี คือ pap smear test (papanicolaou smear) และ HPV DNA test (Zur Hausen, 1996) อย่างไรก็ตาม pap smear test ไม่เพียงพอต่อการวินิจฉัยว่าเซลล์ที่ผิดปกติจะพัฒนาเป็นมะเร็งปากมดลูกในระยะลุกลามได้หรือไม่ อีกทั้งยังอาจให้ผลผิดพลาดในกรณีที่นรีแพทย์มีประสบการณ์น้อยในการแปลผลตรวจ (Banik *et al.*, 2011) ดังนั้น HPV DNA test จึงเป็นที่นิยมมากกว่า เนื่องจากมีความจำเพาะต่อการดำเนินโรค อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบและทำนายการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ (Wright *et al.*, 2000)

สารพันธุกรรมของ HPV เป็น DNA ประมาณ 8,000 คู่เบส เรียงตัวเป็นวงกลม (double stranded circular DNA) ประกอบด้วย early gene (*E1 – E7*) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการจำลองตัว การดำรงอยู่ของไวรัส และการเปลี่ยนรูปของเซลล์ (cell transformation), late gene (*L1* และ *L2*) ทำหน้าที่สร้างโปรตีนองค์ประกอบของเปลือกหุ้ม (capsid) และ long control region (*LCR*) ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการถอดรหัส (transcription) (Tjiong *et al.*, 2001) รูปแบบของการติดเชื้อ HPV มี 2 แบบ คือ 1) แบบ episome และ 2) แบบ integration โดยที่รูปแบบ integration เป็นรูปแบบที่พบได้มากกว่า อีกทั้งการติดเชื้อรูปแบบนี้ ยีน *E2* ซึ่งปกติจะยับยั้งการแสดงออกของยีน *E6* และ *E7* จะถูกทำลาย ส่งผลให้ยีน *E6* และ *E7* ซึ่งเป็น oncogenic gene คือมีความสามารถทำให้เซลล์เปลี่ยนคุณสมบัติของการเจริญเติบโต กลายเป็นเซลล์ที่เจริญโดยไม่มีวันตาย เกิดการแสดงออกมากกว่าปกติ (overexpression) (Woodman *et al.*, 2007) โดยเป้าหมายของโปรตีน E6 และ E7

2788028802

คือ *TP53* และ *retinoblastoma* (*Rb*) ตามลำดับ ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) โปรตีน E6 จะจับกับ E6AP ทำให้เกิดการย่อยสลายของ p53 ผ่านกระบวนการ ubiquitin degradation (Beaudenon and Huibregtse, 2008) ในขณะที่โปรตีน E7 จะจับกับ pRb ซึ่งปกติแล้ว pRb จะจับกับ E2F transcription factor ส่งผลให้ E2F เป็นอิสระ จึงเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และการแบ่งตัวของเซลล์อย่างไม่หยุดยั้ง (Arroyo *et al.*, 1993)

นอกจากนี้ การศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิเลชัน และการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่นำไปสู่การเกิดมะเร็ง เช่น มีรายงานการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูกถึง 93% (Kitkumthorn *et al.*, 2006) ซึ่งยีน *CCNA1* มีหน้าที่ได้แก่ 1) ขับเคลื่อนวัฏจักรของเซลล์ให้เข้าสู่ช่วง G1/S ในอัณฑะ (Ji *et al.*, 2005) 2) ชักนำให้เกิด mitotic catastrophe ใน hematopoietic progenitor cells จึงนำไปสู่มะเร็งไต รังไข่ และปอด (Rivera *et al.*, 2006) ทว่า หน้าที่อีกอย่างหนึ่งของยีน *CCNA1* เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมการฉีกขาดของดีเอ็นเอสายคู่ผ่านกระบวนการ non-homologous end joining และโปรตีน Ku70 (Muller-Tidow *et al.*, 2004) หน้าที่นี้เองแสดงให้เห็นว่ายีน *CCNA1* อาจมีบทบาทเป็นยีนต้านมะเร็ง เนื่องจากหนึ่งในหน้าที่ของยีนต้านมะเร็ง คือ การซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายภายในเซลล์ ดังนั้น การเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ซึ่งนำไปสู่การยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้ (Kitkumthorn *et al.*, 2006) จึงมีผลต่อการยับยั้งหน้าที่ในการซ่อมแซมดีเอ็นเอดังกล่าว และอาจทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูกในที่สุด อีกทั้งมีการศึกษาพบว่า ยีน *CCNA1* อาจเป็นยีนต้านมะเร็งในมะเร็งโพรงหลังจมูก และมะเร็งศีรษะและคอ โดยพบว่ามะเร็งทั้ง 2 ชนิดนี้มีการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* เช่นเดียวกัน (Yanatatsaneejit *et al.*, 2008; Tokumaru *et al.*, 2004)

สภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetics) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของยีนโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรม (Berger *et al.*, 2009) ซึ่งการเกิดดีเอ็นเอเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีนเป็นหนึ่งในกลไกของ epigenetics เช่นกัน มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไวรัส และดีเอ็นเอเมทิเลชัน เช่น การศึกษาความเชื่อมโยงกันของ Epstein-Barr virus (EBV) และการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *BIM* ใน Burkitt's lymphoma พบว่ามีเมทิเลชันของยีน *BIM* ใน B-cell ที่ติดเชื้อ EBV แต่ไม่มีเมทิเลชันใน B-cell ที่ไม่ติดเชื้อ (Paschos *et al.*, 2009) เช่นเดียวกันกับ EBV latent membrane protein1 (LMP1) สามารถกระตุ้นและเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ DNA methyltransferase I (DNMT1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ดำรงการเกิดเมทิเลชันภายในเซลล์ ส่งผลให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ และการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน E-cadherin (Tsai *et al.*, 2006) รวมถึงการพบความเกี่ยวข้องกันระหว่างการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* และรูปแบบการติดเชื้อ HPV แบบ integration (Yanatatsaneejit *et al.*, 2011) และการพบว่าโปรตีน E7 ของ HPV สามารถเพิ่มกิจกรรมของ DNMT1 และลดระดับโปรตีน E-cadherin ได้ (Laurson *et al.*, 2010) อีกทั้ง ยังพบว่า โปรตีน E7 มีความสามารถในการจับกับ DNMT1 ได้อีกด้วย (Burgers *et al.*, 2007)

จากการศึกษาที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้นนำไปสู่สมมติฐานว่า โปรตีน E7 ของ HPV ชนิด 16 เป็นตัวชักนำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ซึ่งอาจมีบทบาทเป็นยีนต้านมะเร็ง

2788028802

ผ่านการทำงานร่วมกับ DNMT1 ทำให้ยีน *CCNA1* ไม่สามารถแสดงออกได้ และอาจนำไปสู่การเกิดมะเร็งปากมดลูก ถึงแม้ว่าปัจจุบันมีวัคซีนเพื่อป้องกันมะเร็งปากมดลูก อย่างไรก็ดี ข้อจำกัดของวัคซีนมะเร็งปากมดลูก คือ อาจก่อให้เกิดอาการแพ้ในบุคคลบางกลุ่ม อีกทั้งผู้ที่ได้รับวัคซีนควรมีอายุระหว่าง 19 ถึง 26 ปี ทั้งยังต้องไม่เคยผ่านการมีเพศสัมพันธ์ (American Cancer Society [ACS] 2013: online) เพื่อปิดช่องโหว่ของการรักษามะเร็งปากมดลูกในจุดนี้ ผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้จึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกในอนาคต เช่น การทำยีนบำบัด (gene therapy) ตลอดจนการคิดค้นยาที่รักษามะเร็งปากมดลูกได้ตรงเป้าหมายมากขึ้น เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ และการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูก
2. เพื่อศึกษาผลของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ในการทำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูก
3. เพื่อศึกษากลไกของโปรตีน E7 ของ HPV ชนิด 16 ในการทำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูก

2788028802

ขอบเขตการวิจัย

นำเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa (มีการติดเชื้อ HPV ชนิด 16) และ C33A (ไม่มีการติดเชื้อ HPV) มาวิเคราะห์การเกิดโพรโมเตอร์เมทิเลชัน และการแสดงออกของยีน *CCNA1*และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ ต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* โดยการให้ยา 5'-azacytidine แก่เซลล์ SiHa และ C33A โดยเทคนิค MSP และ RT-PCR ตามลำดับ จากนั้น จึงศึกษาผลของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ต่อการแสดงออกของยีน *CCNA1* โดยเทคนิค small interfering RNA (siRNA) ในเซลล์ SiHa และการทรานสเฟ็กยีน *E7* เพื่อทำให้ยีน *E7* มีการแสดงออกในเซลล์ C33A แล้วตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *E7* และ *CCNA1* โดยเทคนิค real-time PCR พร้อมทั้งตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยเทคนิค MSP และในลำดับสุดท้าย เป็นการวิเคราะห์ว่าโปรตีน E7ของ HPV ชนิด 16 มีบทบาทต่อการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการแสดงออกของยีน *CCNA1* โดยเทคนิค chromatin immunoprecipitation (ChIP) ซึ่งทำการทดลองในเซลล์ C33A ที่ได้รับการทรานสเฟ็กยีน *E7* และ emypty plasmid แบบชั่วคราว และใช้แอนติบอดี E7 HIS DNMT1 H3K4 และ IgG ในการตกตะกอนของโปรตีน E7, DNMT1 และ H3K4 จากนั้นใช้ไพรเมอร์ของยีน *CCNA1* บริเวณโพรโมเตอร์ในการทำ PCR เพื่อยืนยันว่าโปรตีน E7 ของ HPV ชนิด 16 และ DNMT1 จับกับบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบกลไกของโปรตีน E7 ของ HPV ชนิด 16 ในการทำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นยีนต้านมะเร็งในมะเร็งปากมดลูก

2. การสูญเสียการทำงานของยีนต้านมะเร็งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดมะเร็ง ในอนาคตความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้อาจเป็นอีกทางเลือกในการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูก เช่น การทำ gene therapy หรือการคิดค้นยาในการรักษา เป็นต้น

วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยเรื่องนี้แบ่งออกเป็น 4 การทดลองคือ

1. การตรวจการติดเชื้อ HPV และระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ และระดับการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A

1.1 เพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A

1.2 สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งสองสายพันธุ์

1.3 ตรวจสอบการติดเชื้อ HPV ด้วยการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *L1*

2. การศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการแสดงออกของยีน *CCNA1*

2.1 เพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A

2.2 ให้ยา 5'-azacytidine ที่ความเข้มข้นต่างๆ แก่เซลล์ทั้งสองสายพันธุ์

2.3 สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งสองสายพันธุ์ และทำ sodium bisulfite treatment เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันของยีน *CCNA1*

2.4 สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ทั้งสองสายพันธุ์ และทำ RT-PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน *CCNA1*

3. การศึกษาการชักนำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16

3.1 การยับยั้งการแสดงออกของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ในเซลล์ SiHa โดยเทคนิค small interfering RNA (siRNA)

3.1.1 ออกแบบ siRNA ที่จำเพาะต่อยีน *E7* และหาปริมาณ *E7* siRNA และระยะเวลาทรานสเฟ็กที่เหมาะสม

3.1.2 ทรานเฟ็ก *E7* siRNA ปริมาณที่เหมาะสม เข้าสู่เซลล์ SiHa

3.1.3 หลังจากทรานสเฟ็กจนครบตามระยะเวลาที่เหมาะสมแล้วสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ SiHa ที่ถูกทรานสเฟ็ก แล้วสังเคราะห์ cDNA และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *E7* และยีน *CCNA1* ด้วยเทคนิค real-time PCR

3.1.4 สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ SiHa ที่ถูกทรานสเฟ็ก และทำ sodium bisulfite treatment เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันของยีน *CCNA1*

2788028802

3.2 การชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ในเซลล์ C33A

3.2.1 ถ่าย *E7* recombinant plasmid เข้าสู่ competent cells

3.2.2 สกัดพลาสมิด และตรวจสอบยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ใน competent cells ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid

3.2.3 ทรานสเฟ็ก *E7* recombinant plasmid และ empty plasmid เข้าสู่เซลล์ C33A

3.2.4 สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ C33A ที่ถูกทรานสเฟ็ก แล้วสังเคราะห์ cDNA และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *E7* และยีน *CCNA1* ด้วยเทคนิค real-time PCR

3.2.5 สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ C33A ที่ถูกทรานสเฟ็ก และทำ sodium bisulfite treatment เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันของยีน *CCNA1*

4. การศึกษาการจับกันระหว่างโปรตีน E7 และ DNMT1 บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*

4.1 เพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก C33A

4.2 ทรานสเฟ็ก *E7* recombinant plasmid และ empty plasmid เข้าสู่ C33A เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

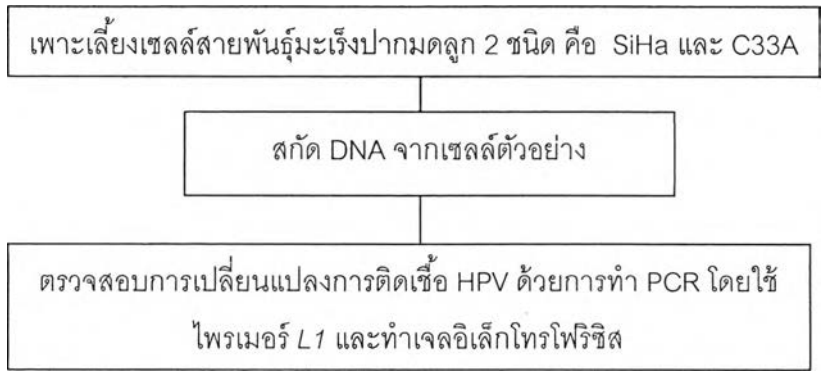
4.3 นำเซลล์ที่ได้รับการทรานสเฟ็กมาทำ chromatin immunoprecipitation (ChIP) โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน HIS, E7, DNMT1, H3K4 และ IgG

4.4 ทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ยีน *CCNA1* บริเวณโพรโมเตอร์ เพื่อยืนยันว่าโปรตีน E7 และ DNMT1 สามารถจับกับบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ได้

2788028802

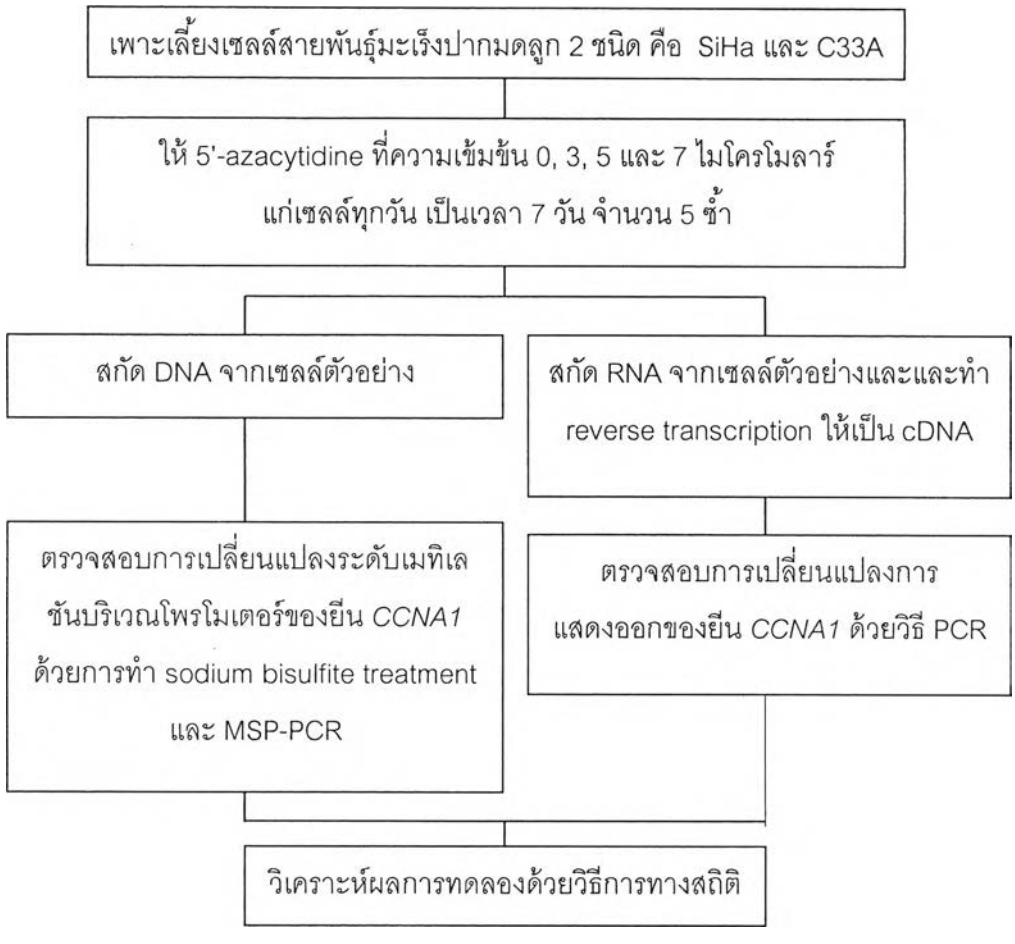
ลำดับขั้นตอนในการวิจัย

1. การตรวจการติดเชื้อ HPV และระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ และระดับการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A



รูปที่ 1 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยการทดลองที่ 1

2. การศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการแสดงออกของยีน *CCNA1*



รูปที่ 2 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยการทดลองที่ 2

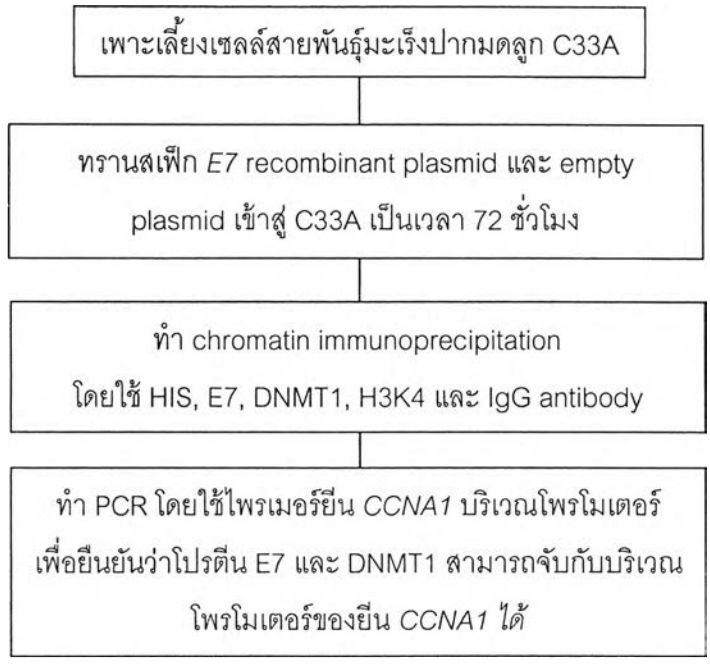
2788028802

3. การศึกษาการชักนำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยยีน *E7* ของ HPV ชนิด

รูปที่ 3 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยการทดลองที่ 3

2788028802

4. การศึกษาการจับกันระหว่างโปรตีน E7 และ DNMT1 บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*



รูปที่ 4 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยการทดลองที่ 4

2788028802